

EFEITO DO PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE (Aβ₂₅₋₃₅) SOBRE A BIOSÍNTESE DE GANGLIOSÍDIOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO GM1

Fernanda dos Santos Petry, Fernando Kreutz, Rudimar Luiz Frozza, Ana Carolina Breier, Leticia Ferreira Pettenuzzo, Carlos Alexandre Netto, Christianne Gazzana Salbego e Vera Maria Treis Trindade. (Dep. Bioquímica - ICBS - UFRGS;)

INTRODUÇÃO

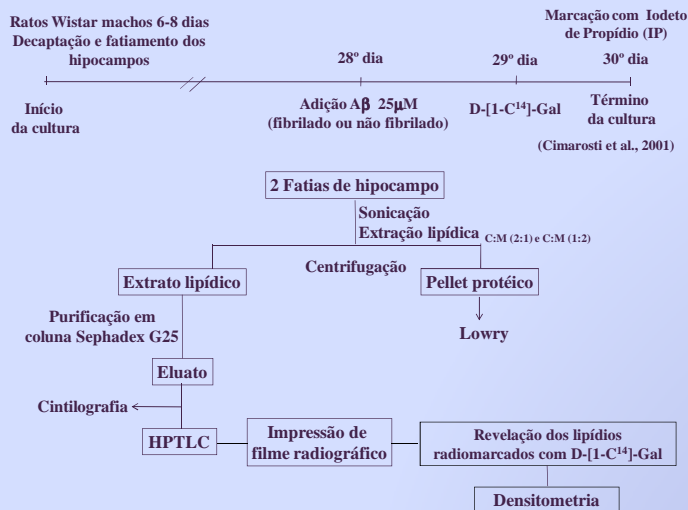
A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa que leva à perda progressiva da memória e das demais funções cognitivas. Embora sua patogenia não esteja completamente elucidada, atribui-se ao peptídeo beta-amilóide (Aβ), em sua forma oligomérica ou fibrilada, um importante papel no processo degenerativo (Suh e Checler, 2002). Uma vez que a produção do beta-amilóide, bem como sua posterior fibrilação, são eventos que se processam em nível de membrana neural, a dinâmica e a composição lipídica da mesma podem modular a cascata amilóide e assim interferir na extensão do dano a ser gerado (Yanagisawa, 2007; Zinser et al., 2007). Neste sentido, diversos estudos tem atribuído aos gangliosídeos – família de glicosíngolipídios de membrana – um papel ativo nestes processos, facilitando a maturação e o processamento da proteína precursora amilóide, bem como acelerando a fibrilação do Aβ (Ariga et al., 2008). Além disso, em virtude do potencial papel sinalizatório dos diferentes gangliosídeos, alterações em sua expressão e distribuição podem ter efeitos diretos sob a viabilidade celular, a plasticidade neuronal e a comunicação célula-célula.

OBJETIVOS

Este trabalho avaliou o efeito do peptídeo beta-amilóide (Aβ₂₅₋₃₅), em sua forma fibrilada e não fibrilada, sobre a biossíntese dos gangliosídeos utilizando o modelo de cultura organotípica de hipocampo. Além disso, estudou o efeito neuroprotetor do GM1 no mesmo modelo.

METODOLOGIA

AVALIAÇÃO DA BIOSÍNTESE DOS GANGLIOSÍDIOS



AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO GANGLIOSÍDIO GM1



ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma e de duas vias, seguida de Post Hoc por teste de Tukey (n = 6).

RESULTADOS

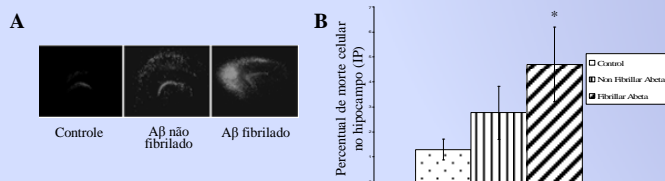


Figura 1: Toxicidade induzida por exposição de 48h das culturas organotípicas hipocampais ao peptídeo Aβ₂₅₋₃₅ (25µM) não fibrilado e fibrilado: (A) fotomicrografias representativas das fatias marcadas com Iodeto de Propídio (IP) no final do tratamento; (B) análise quantitativa do dano hipocampal após cada tratamento com Aβ₂₅₋₃₅ não fibrilado e com Aβ₂₅₋₃₅ fibrilado respectivamente. As barras representam a média +S.D., n=8. (*) Significativamente diferente das culturas controles.

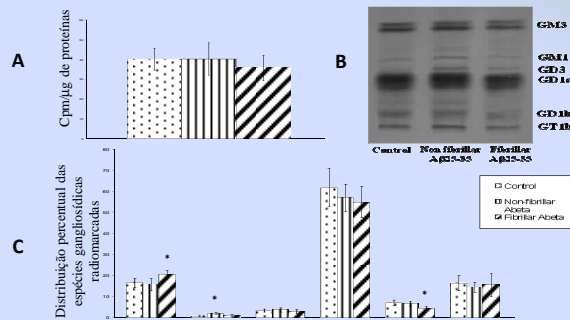


Figura 2: Efeito do Aβ₂₅₋₃₅ em suas formas não fibrilada e fibrilada no perfil e na distribuição das espécies gangliosídicas radiomarcadas: (A) Quantificação da radiomarcagem de gangliosídeos totais (cpm/mg proteína) obtida das culturas organotípicas de fatias hipocampais expostas às diferentes formas de agregação do Aβ₂₅₋₃₅. As barras representam a média + S.D., n=8. (B) HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) dos gangliosídeos endógenos radiomarcados com D-[1-¹⁴C] galactose nas culturas organotípicas de hipocampo. A posição de padrões de gangliosídeos co-cromatografados está indicada. A cromatografia apresentada é representativa de um total de oito experimentos independentes; (C) Distribuição gangliosídica nas culturas organotípicas de fatias hipocampais expostas às diferentes formas de agregação do Aβ ou não expostas ao peptídeo (controle). Os resultados correspondem à análise densitométrica das autoradiografias de 8 HPTLC's, representativas da cromatografia mostrada na figura 2A. O resultado para cada gangliosídeo é expresso como um percentual da radioatividade total incorporada em todas as bandas gangliosídicas. Os resultados são expressos como uma média percentual +S.D., n=6. (*) Significativamente diferente das culturas controles.

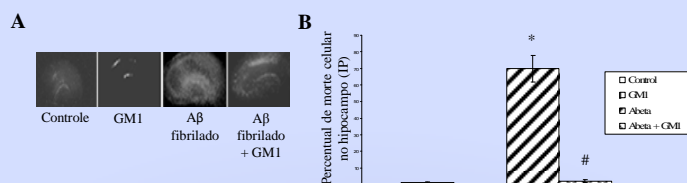


Figura 3: Efeito do tratamento com GM1 sobre a morte celular induzida pelo Aβ₂₅₋₃₅ fibrilado. As fatias foram tratadas ou não com GM1 (10µM) no 26º dia in vitro. No 28º dia in vitro, Aβ₂₅₋₃₅ fibrilado foi adicionado ao meio e a morte celular foi analisada após 48h da sua incubação pela captura de IP. (A) Fotomicrografias representativas das fatias marcadas com IP; (B) análise quantitativa do dano hipocampal. As barras representam a média + S.D., n=5. (*) Significativamente diferente das culturas controles, (#) significativamente diferente das fatias tratadas com Aβ₂₅₋₃₅.

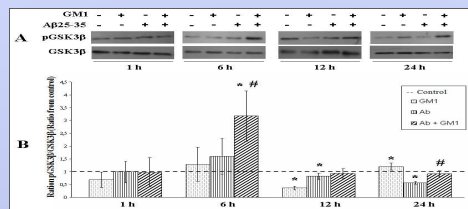


Figura 4: Efeito do tratamento com GM1 (10µM) sobre a alteração da GSK3β induzida pelo Aβ₂₅₋₃₅ fibrilado. (A) Western blotting representativo da fosfo-GSK3β e da GSK3β total após cada tratamento; (B) histogramas representando a análise do Western blotting quantitativo do estado de fosforilação da GSK3β. Os valores densitométricos obtidos para fosfo-GSK3β e GSK3β total foram inicialmente normalizados para os seus respectivos controles. Os valores controles são mostrados como uma linha horizontal. Os dados são expressos como uma proporção da relação normalizada fosfo-GSK3β/GSK3β. As barras representam a média + S.D., n=3 para 1, 6 e 12h de tratamento e n=5 para 24h de tratamento. (*) Significativamente diferente da respectiva cultura controle, (#) significativamente diferente do respectivo grupo tratado com Aβ₂₅₋₃₅ fibrilado.

CONCLUSÕES

- O beta-amilóide apresentou maior toxicidade quando em sua forma fibrilada (IP).
- O peptídeo afetou a expressão dos gangliosídeos, efeito que foi dependente de seu estado de agregação: Em sua forma fibrilada, aumentou a biossíntese/turnover de GM3 e diminuiu a de GD1b; ao passo que em sua forma não fibrilada foi capaz de aumentar a síntese de GM1.
- Uma vez que GM3 é considerado um gangliosídeo apoptótico, um aumento em sua expressão pode contribuir para os efeitos tóxicos desencadeados pelo peptídeo fibrilado (Sohn et al., 2006; Valaperta et al., 2006).
- O GM1, por sua vez, é considerado neuroprotetor em diferentes modelos experimentais, apresentando atividade antioxidante e neurotrófica (Mocchetti, 2005). Por outro lado, a este gangliosídeo é atribuído o efeito de acelerar a fibrilação do beta-amilóide (Matsuzaki, 2007).
- Assim, um aumento na expressão de GM1 pode representar a curto prazo, uma resposta adaptativa e neuroprotetora das células frente ao insulto, mas a longo prazo pode favorecer a conversão do beta-amilóide de sua forma não-fibrilada em sua forma fibrilada, supostamente mais tóxica.
- GM1, administrado exogenamente, apresentou efeito neuroprotetor, sendo capaz de reverter a ativação da GSK3β mediada pelo Aβ₂₅₋₃₅.
- Nossos resultados corroboram a participação dos gangliosídeos no presente modelo de Doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- Ariga, T.; McDonald, M. P.; Yu, R. K. J. Lipid Res. 49: 1157-1175, 2008.
- Cimarosti, H.; Rodnight, R.; Tavares, A.; Paiva, R.; Valentim, L.; Rocha, E.; Salbego, C.; Neurosci Lett. 315: 33-36, 2001.
- Matsuzaki, K. Biochim Biophys Acta. 1768:1935-1942, 2007.
- Mocchetti, I. Cellular and Molecular Life Sciences, 60:2283-2294, 2005.
- Sohn, H.; Kim, Y.S.; Kim, H.T.; Kim, C.H.; Cho, E.W.; Kang, H.Y.; Kim, N.S.; Kim, C.H.; Ruy, S.E.; Lee, J.H.; Ko, J.H. FASEB Journal. 20:1248-1250, 2006.
- Suh, Y. and Checler, F. Pharmacological Review, 54:469-525, 2002.
- Valaperta, R.; Chigorno, V.; Basso, L.; Prinetti, A.; Bressiani, R.; Preti, A.; Miyagi, T.; Sonnino, S. FASEB Journal. 20:1227-1232, 2006.
- Yanagisawa, K. Biochim. Biophys. Acta. 1768:1943-1951, 2007.
- Zinser, E.G.; Hartmann, T. and Grimm, M.O.W. Biochim. Biophys. Acta. 1768: 1991-2001, 2007

AGRADECIMENTOS

FAPERGS; PRONEX-FAPERS; IBNnet/CNPQ; PIBIC-CNPQ/UFRGS, CNPQ.